MUNICH

1967

Über ein Enzym-erhöhendes Virus von Mäusen (Riley-Virus): V. Vorkommen von Riley-Virus bei kleinen Laboratoriumstieren, sowie Isolierung und Charakterisierung zweier Viruslinien von wild-lebenden Mäusen

INGRID KIRSCHENHOFER

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Büngeler

Über ein Enzym-erhöhendes Virus von Mäusen (Riley-Virus): V. Vorkommen von Riley-Virus bei kleinen Laboratoriumstieren, sowie Isolierung und Charakterisierung zweier Viruslinien von wild-lebenden Mäusen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ingrid Kirschenhofer
aus München

München 1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München:

Berichterstatter:	Prof.Dr.A.Georgii
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.W.Büngeler
Dekan:	Prof.Dr.F.Holle
Tag d.mündl.Prüfung:	5.12.67

MEINEN ELTERN

GEWIDMET

I n h a l t s ü b e r s i c h t

A. E I N L E I T U N G

Riley-Virus (RV) ist ein sehr kleines Virus (69 x 76 m/u) das 1960 von Riley in Impfgeschwülsten der Maus entdeckt und seither von einigen Autoren genauer beschrieben worden ist (Adams et al., 1; Georgii, 4; Georgii et al., 6; Notkins et al., 14, 15; Prechtel, 16; Riley et al., 19;).

Das Riley-Virus zeichnet sich aus durch eine sofortige Beeinflussung verschiedener Enzyme des Blutserums von Mäusen, die es auf 5- und 10-fache Ausgangswerte anhebt, was einerseits durch eine Blockade der Enzymclearence wohl durch Virusvermehrung im RES erklärt wird, andererseits aber offenbar auch durch ein erhöhtes Einströmen von endogenem Enzym in das Serum verursacht wird (Mahy et al,12).

Die bemerkenswerte Eigenschaft von RV ist, daß nach Infektion und sehr kurzer Viruseklipse eine lebenslange Virämie der Tiere mit lebenslang erhöhten Serumfermenten bestehen bleibt. Über die Einflüsse auf den Enzymspiegel bei tumortragenden Mäusen wurde von verschiedenen Autoren berichtet (Adams et al., 1; Georgii, 4; Rauen, H.Hupe 17; Riley et al., 20;).

Über die weitere Charakterisierung von Eigenschaften dieses Virus haben verschiedene Autoren berichtet (Bladen et al.,3; Georgii, 5; Georgii et al., 8; Lenz, 10; Prechtel, 16; Rowson et al., 21; Zobl, 22;).
In jüngster Zeit ist die Vermehrung des RV in Zellkulturen von Mäuseembryonen gelungen (Anderson et al., 2; Georgii et al., 7;).

Im Zusammenhang mit der ausgedehnten Durchseuchung von tumortragenden Mäusen mit Riley-Virus erschien es uns wichtig, die spontane epidemiologische Durchseuchung von Tierkolonien mit dem Virus zu untersuchen. Diese Frage ist unseres Wissens bisher nicht behandelt worden und wir haben sie im wesentlichen auf gekaufte und selbst gezüchtete Versuchsmäuse sowie auf wildlebende graue Mäuse,die wir selbst gefangen haben, ausgedehnt. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in zwei Abschnitten dargestellt, die abschließend gemeinsam besprochen werden.

B. MATERIAL und METHODE

1. Versuchstiere
   a) ausgewachsene weiße Mäuse des Stammes NMRI aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover.
   b) C3H/J/Hc-Mäuse aus der Versuchstierzucht Hannover.
   c) Swiss-Mäuse: NMRI-Kolonie-Zucht aus der Versuchstierzucht Wiga.
   d) Ratten: institutseigene Kolonie-Zucht einer Wistar-Linie.
   e) Goldhamster: Goldhamster-Farm.R.Schneider,Rottach Tegernsee
   f) wildlebende graue Mäuse: lebend durch Fallen in Räumen und Umgebung unseres Institutes und auf Feldern in der Umgebung Heidelbergs gefangen.

2. Allgemeine Methoden zum Virusnachweis

a) Herstellung eines zellfreien Organextraktes:
Leber, Milz und Nieren wurden den getöteten Tieren steril entnommen, mit Hanks-Lösung 1:10 verdünnt, im Dispergiergerät Ultra-Turrax in der Kälte homogenisiert und das Homogenat, nachdem es 40 Min. bei + 4°C aufbewahrt wurde, bei 4500/U/Min. zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde unter Stickstoffdruck durch einen Seitz-EKS-II-Filter gepreßt. Nach bakteriologischer Prüfung durch Ausimpfen in Merck-Bouillon-Kulturen wurde das sterile Filtrat in einer Injektionsdosis von 0,5 ml intraperitoneal (i.p.) verabreicht.

b) Gewinnung eines sterilen Serumfiltrats:
Nach der von Riley (Riley, 17;) angegebenen Methode wurden Tiere durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Hilfe von Glaskapillaren ausgeblutet. Die Kapillaren wurden 20 Min. in der Zentrifuge (Modell Stock) bei 2500 U/Min. zentrifugiert und das überstehende Serum in einem Gläschen gesammelt,

1:10 mit Hanks-Lösung verdünnt, unter Stickstoffdruck durch Seitz-EKS-Filter geschickt und nach Ausimpfen auf Merck-Bouillonkulturen 0,5 ml i.p. den Versuchstieren injiziert.

c) Serumgewinnung und photometrische Fermentbestimmung:
Durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Glaskapillaren wurde den mit Äther narkotisierten Tieren ca 0,4 ml Blut entnommen. Das erhaltene Blut wurde 20 Min.bei 2500 U/ Min. zentrifugiert.
Aus dem überstehenden Serum wurde das LDH-Ferment im optischen Test nach Warburg bei 366 m/u im Eppendorf-Photometer gemessen.
Als Reagentien verwendeten wir die Puffer Pyruvat-Substrate und DPNH der Fa.Boehringer & Söhne,Mannheim. Die Fermenterhöhung wurde in Einheiten nach Bücher berechnet und die obere Grenze des Normalwertes mit 50 Büchereinheiten festgelegt.

d) Organ und Serumübertragungen (Passagen):
Für die Organ- und Serumübertragungen von NMRI/Ha und NMRI/Ga Mäusen wurden sterile Filtrate der Organe Leber, Milz und Nieren, sowie ein steriles Filtrat des Serums nach der oben angegebenen Methode hergestellt; Verschiedene Gruppen von Mäusen, deren Ausgangs- oder Leerwert an LDH als normal befunden wurde, wurden intraperitoneal injiziert. Vier Tage später wurde die Serum-LDH bestimmt (s.o.), die Tiere getötet, wiederum filtrierte Extrakte der Organe und Serum neuen Mäusen injiziert. Diese Übertragungen (Passagen) wurden bis zu 7-mal durchgeführt und der LDH-Wert nach der 7.Passage 4 Wochen lang kontrolliert.

3. Methoden zur Untersuchung wildlebender Mäuse:
Von den wilden Mäusen stellten wir ein zellfreies Organfiltrat (s.o.) aus Leber, Milz und Nieren her und injizierten (40 Gruppen á 3 NMRI/Ha Mäusen) jeder Maus deren LDH-Wert

vorher bestimmt wurde und der nie 35 BüE überschritt, 0,5 ml i.p. Nach 4 Tagen wurde der LDH-Gehalt der beimpften Mäuse bestimmt und von den Tiergruppen mit hohem LDH-Gehalt weitere Organpassagen durchgeführt. Die 2 Tiergruppen, die nach der 9.Organpassage noch einen hohen LDH-Wert aufwiesen wurden in Trockeneis aufbewahrt, nach 3 Wochen weiter untersucht, und dann schließlich ein Virus isoliert. Die zwei virushaltigen Tiergruppen bezeichneten wir mit Wilde Münchner Maus eins und zwei (WMM_1 und WMM_2).

4. Methoden zur Charakterisierung von WMM_1 und WMM_2 - Virus

a) Von den in Trockeneis aufbewahrten unsterilen Organfiltraten von WMM_1 und WMM_2 (siehe 3.) der 9. Passage wurden durch Filtration sterile Organfiltrate erhalten, mit Hanks-Lösung eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt, Gruppen zu je 2 NMRI-Mäusen beimpft und am 1., 2., 4., 10.Tag die Serum-LDH bestimmt. In gleicher Weise wurden Mäuse mit dem Riley-Virus aus SarkomI (RV-SaI) untersucht und so der Verlauf des Infektionstiters von WMM_1 und WMM_2 -Virus im Vergleich zum RV-SaI festgestellt.
RV stammt aus dem Mäuseimpftumor Landschütz-SarkomI. Der Tumor war 1952 als ein retroperitoneales Retothelarkom der Maus spontan entstanden und konnte erfolgreich auf Mäusen transplantiert werden (Löblich et al., 11;).

b) Zur Bestimmung des Infektionstiters von WMM_1 und WMM_2 - Virus auf Tumormäusen im Vergleich zum RV wurden Gruppen von Mäusen mit RV-freien Krebs-Ascites-Tumor, mit WMM_1 und RV-SaI infiziert, und am 4.Tag nach Virusinfektion das Serum Ascites und Organe getrennt steril gewonnen, eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt und von jeder Verdünnung 0,5 ml je 2 Tieren i.p. injiziert. Nach weiteren 4 Tagen wurde der Serum-LDH-Wert dieser beimpften Tiere bestimmt.

c) Primäre Mäuseembryonalkulturen (MEK) wurden 24 Stunden nach dem Ansetzen mit WMM_1 bzw. WMM_2-Virus beimpft und im 5-Tage-Rhythmus immer wieder auf frische, neu angesetzte MEK übertragen. Jeden 2.Tag wurde das Medium gewechselt und damit NMRI/Gassner Mäuse beimpft, deren LDH-Wert dann bestimmt wurde.

d) RV-haltige Lösungen:
NMRI/Ga Mäusen wurde Krebs-Ascites-Tumor und gleichzeitig WMM_1, WMM_2 und RV-SAI injiziert. Aus den drei Gruppen der beimpften Mäuse wurde den Tieren nach 4 Tagen der Ascites entnommen und anschließend 1 : 1 mit Phosphat gepufferter Salzlösung verdunnt, im Bühler-Homogenisator für 5 Min. bei 10 000 U/Min. homogenisiert, danach auf eine Endverdünnung von 1 : 9 (= 10%ige Tumorlösung) durch Phosphat gepufferte Salzlösung gebracht und für 20 Min. bei + $4^{o}C$ aufbewahrt. Nach Abschleudern der groben Teile durch Zentrifugation bei etwa 3500 U/Min. wurde der Überstand als Viruslösung bezeichnet und für Versuche verwendet.

e) Hitzeinaktivierung:
In getrennten dünnwandigen Röhrchen wurde Viruslösung abgefüllt, im Brutschrank bei $+60^{o}C$ aufbewahrt, und zur Injektion für den Tierversuch nach 10, 15, 30, 60, 120, 180 Min. entnommen. Vor der Injektion wurde die Viruslösung durch ein Glasfilter (G_4) filtriert.

C. ERGEBNISSE

1. Riley-Virus in unbehandelten Mäusen, Ratten und Goldhamstern verschiedener Zuchten.

a) Mäuse:

Die Ergebnisse sind übersichtlich in Tab. 1 dargestellt. Untersucht wurden insgesamt 1 620 Mäuse aus drei verschiedenen Linien und der Durchschnitt der erhaltenen Werte der Serum-LDH ermittelt; danach wurden diese Werte in 2 Gruppen aufgeteilt, wovon die eine den Streubereich von 10 - 50 BüE und die andere den Streubereich von 51 BüE bis zum Höchstwert erfaßt.

Dabei ergibt sich, daß der größte Teil der Tiere nämlich 88,5 bzw. 91,1 % Enzymwerte im niederen Streubereich d.h. 10 - 50 BüE hat, der Rest nämlich 9 - 11 %, hat Werte, die im Mittel zwischen 62 und 67 BüE/ml Serum liegen. Insgesamt ergibt sich ein Durchschnittswert von 33 BüE/ml Serum. Zwischen den aus zwei verschiedenen Zuchtanstalten stammenden drei Mäuselinien bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Es war zu untersuchen, ob die erhöhten Enzym-Werte auf eine RV-Infektion oder auf andere Faktoren zurückzuführen waren. Deshalb wurde zunächst bei 25 Tieren mit einem Mittelwert von 82 BüE und Streubereich 54 - 160 BüE durch fortlaufende Kontrolle das Verhalten der Serum-Enzymwerte bestimmt. Bei 23 von 25 Tieren verringerte sich während dieser Beobachtungszeit der erhöhte LDH-Wert unter den von uns festgelegten oberen Grenzwert der Norm d.h. 50 BüE. Dagegen blieb bei 2 Mäusen die Serum-LDH konstant erhöht, weshalb von diesen Tieren zellfreie Organextrakte auf andere Wirtstiere übertragen wurden, um einen virusartigen Faktor nachzuweisen bzw. auszuschließen.

Es ergab sich, daß ein subzellulärer Faktor d.h. ein RV für die beobachtete Enzymerhöhung verantwortlich war, weil die fermentändernde Wirkung zellfrei übertragen werden konnte und über eine Beobachtungszeit von 4 Wochen erhalten blieb.
Es wurde weiter der Frage nachgegangen, ob die Tiere des oben erwähnten Mäusekollektivs möglicherweise ein latentes RV enthielten, welches keine meßbare Enzymerhöhung induzierte. Aus diesem Grunde wurden Blindpassagen mit zellfreien Organ- bzw. Serumfiltraten über viele Wirtspassagen hinweg durchgeführt und dabei fortlaufend die Serum-Enzyme kontrolliert. Dabei fanden wir, daß so lange unveränderte Serum-Enzyme trotz 7-maliger Passage erhalten blieben, als wir steriles Filtrat von Organen bzw. Serum verwendeten. Sobald unfiltriertes Serum übertragen wurde, fanden wir sowohl bei NMRI/Ga wie bei NMRI/Ha-Mäusen ein nach der zweiten Passage nachweisbares Virus, das für eine konstante LDH-Erhöhung verantwortlich war.
Von derartigen Mäusen war das Riley-Virus zellfrei über Passagen nachweisbar. Dies konnten wir übereinstimmende in 3 verschiedenen Versuchsanordnungen beobachten.
Für ihre Erklärung muß angenommen werden, daß bei der Präparation der Organ- bzw. Serumextrakte eine Verunreinigung durch das auf der Tieroberfläche vorhandene RV erfolgte, welches dann durch unsere Infektionspassagen im Serum wirksam werden konnte.

b) Goldhamster:

Bei 43 Goldhamstern wurden die Serum-LDH-Werte bestimmt. Es ergaben sich bei 90,6 % der Tiere Enzymwerte im Streubereich von 8 - 50 BüE und bei 9,4 % der Tiere Enzymwerte im Streubereich von 51 - 158 BüE.

c) Ratten:

Bei insgesamt 88 Ratten wurde der Serum-LDH-Wert photometrisch bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, wovon die eine den Streubereich von 18 - 50 BüE und die andere den Streubereich von 51 - 180 BüE erfaßt; die Einteilung entspricht dem Verfahren bei Mäusen und Hamstern (Tab.1).
Dabei ergaben sich bei 55,7 % der Tiere Enzymwerte im Streubereich 10 - 50 BüE, während immerhin 44,3 % Enzymwerte im hohen Streubereich d.h. 51 - 180 BüE mit einem Durchschnittswert von 83 BüE hatten. Bei der Untersuchung der Ratten wurden keine Serumübertragungen zum Nachweis oder Ausschluß eines virusartigen Faktors durchgeführt.

d) Besprechung der Befunde:

Bei den Versuchen, RV in Reihenuntersuchungen aus ungebrauchten Mäusen zu isolieren, zeigte sich, daß unter 1 600 Mäusen nur zwei Tiere das RV enthielten, allerdings bleibt unklar, woher das Virus stammt. Weiter ergab sich, daß die Tiere kein inaktiv latentes Virus enthielten, das durch Blindpassagen aktiviert werden konnte. Schließlich ergab sich eine hohe Kontaktinfektiosität des Virus, weil offenbar RV, welches an der Tieroberfläche oder eventuell auch an Gegenständen oder Händen des Experimentators war, bei nicht keimfrei durchgeführten Übertragungspassagen wirksam wurde. Insbesondere die Beobachtung, daß infektiöses Riley-Virus in der Umgebung der Tiere enthalten und hoch infektiös ist, mag für den Virusgehalt der Impftumoren verantwortlich sein.
Mäuse und Goldhamster hatten etwa im gleichen Durchschnitts- und Grenzbereich die als normal zu bezeichnenden Serum-Enzym-Werte von LDH. Ratten dagegen zeigten höhere Mittelwerte der Serum-LDH; deshalb ergab sich ein größerer Prozentsatz

von Tieren mit erhöhten Serum-Enzymwerten. Unsere Versuche lassen offen, ob die hohen Serum-LDH-Werte bei Ratten durch unspezifische Faktoren, wohl durch unbekannte bakterielle Infektionen bedingt sind. Bei Ratten und Goldhamstern wurden nämlich keine virologischen Übertragungsversuche durchgeführt.

2. Isolierung von 2 Wild-Linien des Riley-Virus von freilebenden Mäusen

Es erschien uns von großem Interesse festzustellen, ob bei freilebenden Mäusen RV vorkommen und nachgewiesen werden können. Deshalb haben wir 40 wildlebende Mäuse gefangen und jede einzelne virologisch untersucht. Neun von vierzig gefangenen Mäusen (Tab.1a) hatten einen zellfrei übertragbaren Faktor in den Organen, der bei den Empfängermäusen der 1. Passage einen Anstieg des LDH-Wertes auslöste. Nach der 2. Passage reagierten allerdings nur noch die Empfängertiere von zwei zellfreien Organextrakten mit erhöhten Serum-LDH-Werten. Durch insgesamt sieben weitere zellfreie, nur mit Serum durchgeführte Passagen konnten gleichbleibende Enzymanstiege im Serum der Empfängertiere induziert werden. Dabei blieben die LDH-Werte dieser Empfängermäuse unverändert hoch und fielen auch nach der siebten Serumpassage, während einer Beobachtungszeit von drei Wochen, nicht ab. Damit sind zwei Isolierungen von RV aus vierzig wilden Mäusen gelungen.
Unsere weiteren Experimente sollten nun eine bessere Charakterisierung dieses Virus im Vergleich mit bekannten RV bringen. Dazu haben wir folgende Versuche durchgeführt:
a) Fortlaufende Beobachtung der Serum-LDH-Höhe (Tab.2)
Durch fortlaufende Kontrollen der Serum-LDH-Höhe sollte nach gezielter Infektion und im Vergleich zu bekannten RV die Wir-

kung auf die Serum-LDH verglichen werden. Drei Gruppen zu 10 Mäusen wurden mit sterilen Serumfiltraten von WMM_1 , WMM_2 und RV aus infizierten Spendertieren beimpft. Alle Empfängertiere zeigten bereits nach dem 3.Tag der Beimpfung eine deutliche LDH-Erhöhung. Die Serum-LDH wurde über zwanzig Tage jeden zweiten Tag bestimmt und blieb während dieser Beobachtungszeit bei allen drei Tiergruppen hoch. Vergleicht man die Serumenzymwerte der Tiere, die mit WMM_1 und WMM_2 und RV infiziert waren, so findet man, daß die mit WMM - Virus beimpften Tiere die höchsten Enzymwerte mit einem Durchschnittswert von 114 BüE aufwiesen. Der Mittelwert der mit WMM_1-Virus infizierten Tiere lag bei 94 BüE, der mit Riley-Virus infizierten Tiere bei 95 BüE. Es ergaben sich also keine wesentlichen Unterschiede der Serumenzymwerte bei den drei beimpften Empfängergruppen.

b) Der Infektionstiter von WMM_1 - Virus im Vergleich zu Riley-Virus (Tab.3)

Der Verlauf des Virus-Titers von WMM_1 und RV unmittelbar nach der Infektion wurde mit den unter Methodik angegebenen Verfahren untersucht. Am 1., 2., 4. und 10. Tag wurde der Serum-LDH-Wert der mit den Verdünnungschargen beimpften Empfängermäusen gemessen.

Dabei ergab sich, daß am 1. Tag nach der Injektion der infektiöse Titer von WMM_1 bei 10^8, also um eine Zehnerpotenz, höher lag, als der von RV (10^7); am 2.Tag unterschieden sich die infektiösen Titer nur um eine halbe Zehnerpotenz um am 10.Tag den gleichen Wert, nämlich 10^4 zu erreichen. Auch bezüglich des Verhaltens des Infektionstiters ergeben sich also keine Unterschiede zwischen unserem bekannten RV und der gefundenen Wildlinie WMM_1.

Der Infektionstiter von WMM_1-Virus auf Tumormäusen

RV-freie Mäuse mit 6-Tage altem Krebs-Ascites-Tumor(KAT) wurden mit WMM_1-Virus bzw. RV-SAI intraperitoneal infiziert. Nach Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe von Serum-, Ascites- und Organauszügen dieser beimpften Tiere, vier Tage nach der Injektion, und intraperitonealer Injektion dieser Verdünnungsreihe drei weiterer Gruppen von Mäusen, ergab sich wieder am 4.Tag folgendes: bei WMM_1-Virus infizierten tumortragenden Mäusen betrug der infektiöse Titer des Ascites-Tumors 10^5 und bei RV-infizierten Tumormäusen 2 Zehnerpotenzen weniger, nämlich 10^3. Der Infektionstiter des Organgewebes jedoch war gleich dem Infektionstiter des Tumorascites (10^5). (s.Tab.4)
Beim Vergleich des Infektionstiters von WMM_1-Virus infizierten tumortragenden Mäusen zu tumortragenden RV infizierten Mäusen, fand sich ein um eine Zehnerpotenz höherer Titer im Ascites nach WMM_1 gegenüber RV-SAI. Der Titer des Serums der mit WMM_1-Virus infizierten Tumortiere war um 2,5 Zehnerpotenzen niedriger als nach RV-SAI. Der Infektionstiter der Organgewebe unterschied sich mit 0,5 nicht bemerkenswert.

d) Verhalten von WMM_1 und WMM_2-Virus in Zellkulturen

aa)Qualitativer Virusnachweis aus Gewebekulturen:
Die Injektion von Medium aus Gewebekulturen (MEK), denen WMM_1 und WMM_2 zugesetzt worden war, verursachte bei Mäusen einen für RV typischen Serum-LDH-Anstieg. Dabei wurden beide Viruslinien fortlaufend von primären zu primären MEKS im 5-tägigem Abstand durch flüssiges Medium übertragen, in dem zu jeder Zeit infektiöses Virus enthalten war (Georgii et al. 7).
Es wurden zwei Versuchsreihen bis zu 6 Passagen, d.h. 30 Tage durchgeführt. Das WMM_1 und WMM_2 - Virus zeigte in dieser Zeit keine Änderung seiner enzymerhöhenden Wirkung.

bb) Virustiter von Gewebekulturen mit WMM_1:
Der quantitative Nachweis d.h. die Bestimmung des Infektionstiters wurde bei der Übertragung des 2.Mediums auf neue Kulturen unter Verwendung des flüssigen Mediumüberstandes durchgeführt. Die Ergebnisse über das Riley-Virus wurden nicht aus Parallelversuchen, sondern aus der Arbeit (Georgii et al., 7;) entnommen. Es ergab sich aus den ersten Kulturen nach Infektion mit WMM_1 und WMM_2-Virus ein Infektionstiter von 4,5.
Im Verlauf der sechsten Passage schwankten die Werte des Infektionstiters der beiden Viren zwischen 1 und 6 Zehnerpotenzen (Tab.5).
Jedoch bestand zwischen dem infektiösen Titer von WMM_1 und WMM_2 - Virus kein wesentlicher Unterschied. Die RV-Titer lagen bei 6,5 d.h. um zwei Zehnerpotenzen höher als bei WMM_1 und WMM_2-Virus, während die übrigen Werte des infektiösen Titers im Verlauf der 6 Passagen im Durchschnitt niedriger liegen als bei WMM_1 und WMM_2 - Virus. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Versuche mit dem RV nicht zur gleichen Zeit durchgeführt und somit nicht mit demselben Mäusekollektiv gemessen wurden.

e) WMM_1 und Riley-Virus: Inaktivierung durch Hitze
In diesem Experiment wurde die Möglichkeit durch Hitzeinaktivierung ein Virus zu zerstören als Vergleich unserer isolierten beiden neuen Viruslinien mit uns bekannten RV benützt. Dazu wurden Viruslösungen von WMM_1 und RV nach der oben angegebenen Methode hergestellt, und diese Viruslösungen + 60^oC ausgesetzt. Entnimmt man nach bestimmten Zeitabständen, nämlich nach 10, 15, 30, 60, 120 und 180 Min. 0,5 ml der Viruslösung und injiziert diese gesunden Zuchtmäuse, so findet man, daß beide Viruslösungen jenseits von 60 min. inaktiviert sind. (Tab.6).

Besprechung der Befunde:
RV-ähnliches LDH-erhöhendes Virus konnte bei zwei von vierzig untersuchten wildlebenden Mäusen aus den Organen isoliert werden. Durch langfristige Übertragungen bei Mäusen und durch einige Experimente wurde es mit unserem bekannten RV aus Tumorascites verglichen. Dabei ergaben sowohl die fortlaufende Beobachtung der durch das Virus induzierten Enzymveränderungen wie der Vergleich des Virustiters nach Infektion vergleichbarer Empfängermäuse keinen Unterschied zwischen den beiden von uns isolierten Viruslinien mit den uns bekannten Linien von RV. Auch der Infektionstiter auf Tumormäusen, die mit den 3 verschiedenen Viruslinien infiziert wurden, ergibt keinen Unterschied zu den beiden neuen Viruslinien. Schließlich haben wir auch das Verhalten in Zellkulturen d.h. die Vermehrung in Mäuseembryonalzellen versucht. Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen den von uns isolierten neuen Linien mit unserem eigenen bekannten Virus. Wir haben in früheren Untersuchungen (Georgii et al., 7;) die Replikation von RV grundsätzlich nachweisen können und dazu die infektiösen Titer in vitro bestimmt. Unsere jetzt erhobenen Befunde entsprechen weitgehend unseren früheren Untersuchungen. Damit zeigt auch das Verhalten der von uns isolierten beiden Linien auf Zellkulturen eine weitgehende Übereinstimmung.
Schließlich wurde noch in einem letzten Experiment die physikalische Eigenschaft der Inaktivierung des infektiösen Faktors durch einwirkende Hitze verglichen. Auch hier ergibt sich übereinstimmend, daß eine einstündige Inkubation bei 60° C beide von uns isolierten Viruslinien ebenso wie unser eigenes RV gleichzeitig inaktivieren. Durch diese verschiedenen experimentellen Vergleiche mit jeweils übereinstimmenden Reaktionen der von uns isolierten Viruslinien ist eine ziemlich gute Charakterisierung möglich. Wegen der Übereinstimmung mit unserem Kontrollvirus dürfen wir mit einiger Sicherheit an-

nehmen, Riley-Virus aus den freilebenden Mäusen isoliert zu haben.Selbst wenn nur 2 mal bei 40 untersuchten Wildmäusen die Virusisolierung gelungen ist, so wäre doch bei der hohen Infektiosität dieses Agens die horizontale Ausbreitung in gezüchteten Mäusekolonien wegen des dauernden Kontaktes leicht möglich. Darüber hinaus ist aber gerade das Vorkommen von Riley-Virus im Impftumor, worüber verschiedene Autoren (Adams et al., 1; Georgii, 4; Georgii et al.,6; Mundy et al., 13; Notkins et al., 15; Rauen et al., 17; Riley et al., 20;) mehrfach berichtet haben, im Zusammenhang mit diesem spontanen Vorkommen von RV in Wildmäusen von Interesse. Die Transplantationstumoren werden in den Laboratorien durch fortlaufende und unendliche Tierpassagen gehalten und das Virus vermehrt sich offenbar auch in den Tumorzellen besonders gut, wie eigene Untersuchungen gezeigt haben (Georgii u. Thorn). Dabei ist wieder zu erwähnen, daß die lebenslange Virämie nach Infektion mit Riley-Virus die horizontale Ausbreitung besonders begünstigt. Berücksichtigt man weiter, daß die bei Impftumoren nötigen fortlaufenden Transplantationspassagen eine ständige induzierte virologische Ausbreitung und Aktivierung sind, so wird klar, warum alle Transplantationslinien mit RV durchseucht sind.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde nachgewiesen, daß RV bei den kleinen Laboratoriumstieren, besonders bei Mäusen, so gut wie nicht vorkommt, solange die Tiere aus Zuchtlinien kommen und noch nicht weiter verwendet wurden. Die Isolierung von 2 Wild-Linien eines RV-ähnlichen Virus, wir haben es WMM_1 und WMM_2 genannt, ist aus freilebenden grauen Mäusen gelungen. Diese isolierten Viruslinien verhalten sich bezüglich mehrerer erfaßbarer Charakteristika weitgehend wie unser bekanntes RV aus Landschütz Sarkom SaI. Daraus läßt sich vermuten, daß unsere Mäuse - Zuchtlinien durch natürlich vorkommendes, dem RV-entsprechendes Virus infiziert werden können und bei der lebenslangen Virämie die horizontale Ausbreitung besonders leicht ist.

E. T A B E L L E N

ART DER TIERE	ANZAHL DER UNTERSUCHTEN TIERE	SERUM LDH-WERTE IN BÜCHEREINHEITEN FÜR ALLE TIERE			TIERE MIT NORMALER SERUM-LDH					TIERE MIT ERHÖHTER SERUM-LDH				
		MITTELWERT	BEREICH		ANZAHL	ANZAHL IN %	MITTELWERT	BEREICH		ANZAHL	ANZAHL IN %	MITTELWERT	BEREICH	
NMRI/Ha MÄUSE	400	34	11 – 112		353	88.5 %	30	10 – 50		46	11.5 %	62	51 – 112	
NMRI/Ha MÄUSE	1110	33	10 – 129		987	89.1 %	29	10 – 50		122	10.9 %	66	51 – 129	
C3H/J/Ha MÄUSE	110	33	15 – 130		100	91.0 %	29	15 – 50		10	9.0 %	77	51 – 130	
GOLD-HAMSTER	43	30	8 – 158		39	90.6 %	24	8 – 50		4	9.4 %	86	51 – 158	
RATTEN	88	54	18 – 180		49	55.7 %	30	18 – 50		39	44.3 %	83	51 – 180	

TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE HÖHE DER SERUM-LDH WERTE BEI LABORATORIUMSTIEREN.

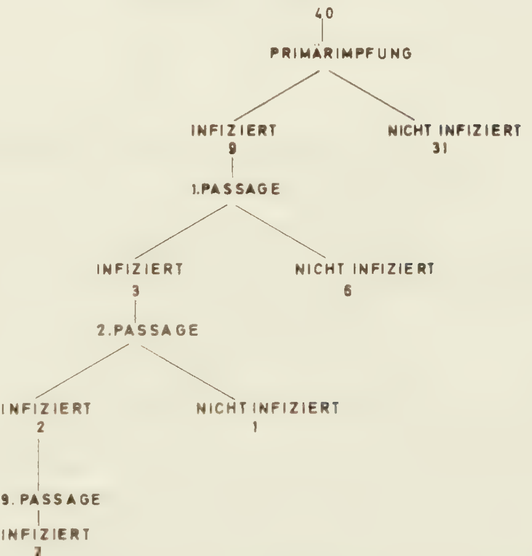


TABELLE 1a: ISOLIERUNG VON RILEY-VIRUS AUS VIERZIG FREILEBENDEN MÄUSEN DURCH ORGANPASSAGEN.

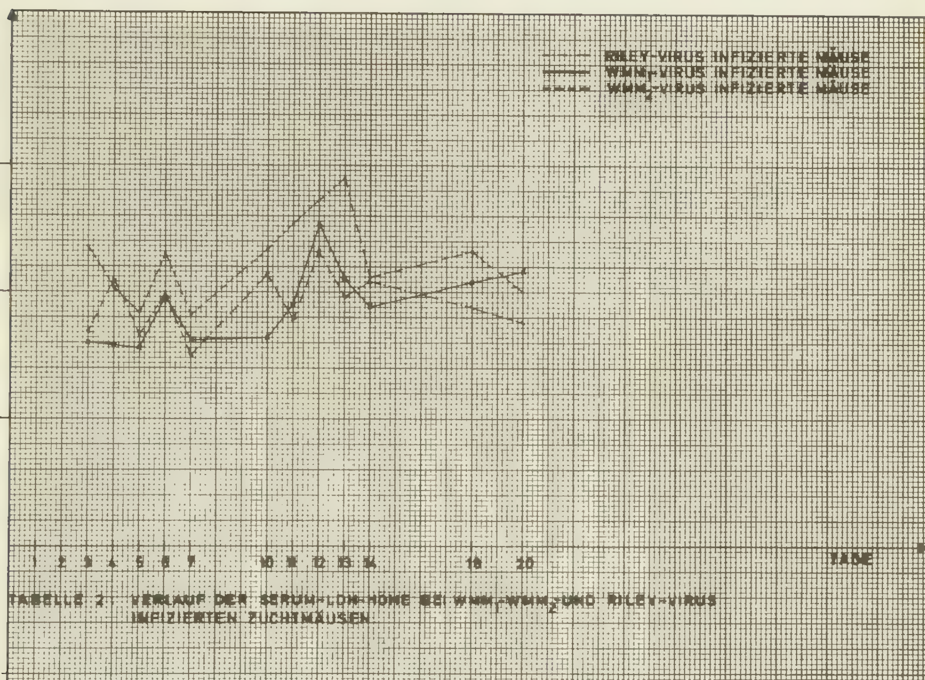


TABELLE 2: VERLAUF DER SERUM-LDH-HÖHE BEI WMM$_1$-WMM$_2$ UND RILEY-VIRUS INFIZIERTEN ZUCHTMÄUSEN

TAGE	1	2	4	10
WMM_1	10^8	$10^{6,5}$	10^{10}	10^4
RV	10^7	10^6	10^9	10^4

TABELLE 3: VERLAUF DES INFEKTIONSTITERS VON WMM_1-VIRUS IM VERGLEICH ZUM RILEY-SAI-VIRUS.

DIE WERTE BEDEUTEN INFEKTIÖSE EINHEITEN AUSGEDRÜCKT IN ZEHNERPOTENZEN.

	KAT+ WMM_1-VIRUS	KAT+RILEY-SAI-VIRUS
SERUM	10^3	$10^{5.5}$
ASCITES	10^5	10^4
ORGANE	10^5	$10^{5.5}$

TABELLE 4: VERLAUF DES INFEKTIONSTITERS VON WMM_1-VIRUS AUF TUMORMÄUSEN IM VERGLEICH ZUM RILEY-SAI-VIRUS

DIE WERTE BEDEUTEN INFEKTIÖSE EINHEITEN AUSGEDRÜCKT IN ZEHNERPOTENZEN.

PASSAGE	0.		1.		2.		3.		4.		5.		6.	
MEDIEN	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
WMM_1		4.5		5.5		8		9		10.5		6.5		8.5
WMM_2		4.5		5.5		3.4		9		10.5		6.5		7.5
RILEY VIRUS		6.5		6.5		9		8.7		5.5		5.2		6.5

TABELLE 5: QUANTITATIVE VIRUSBESTIMMUNGEN IN DEN KULTUR-MEDIEN FORTLAUFENDER PASSAGEN.

MINUTEN	0'	10'	15'	30'	60'	120'	180'
WMM_1	130	124	140	124	116	16	17
RILEY-VIRUS	108	110	121	118	131	21	25
KONTROLLEN	21	25	20	16	30	19	24

TABELLE 6: VIRUSINAKTIVIERUNG DURCH HITZE.

DIE ZAHLEN BEDEUTEN DURCHSCHNITTSWERTE DER LDH-AKTIVITÄT IN BÜCHER-EINHEITEN IM SERUM VON TESTMÄUSEN.

F. LITERATUR

1. Adams, D.H., K.E.K. Rowson a. M.H.Salaman:
The effects of tumors, of leukaemia, and of some viruses associated with them, on the plasma lactic dehydrogenase activity of mice.
Brit. J. Cancer 15, 860 (1961)

2. Anderson, H.C., V. Riley, M.A. Fitzmaurice, J.D.Loveless, P. Philip a. A.E.Moore:
Quantitative study of the lactate dehydrogenase elevating virus in mouse embryo cultures.
J.Nat. Cancer Inst. 36, 89 (1966)

3. Bladen, H.A. a. A.L.Notkins:
Electron microskopic demonstration of the lactic dehydrogenase agent.
Virology 21, 269 (1963)

4. Georgii, A.:
Die Aktivitätsänderung der Lactatdehydrogenase im Serum nach Infektion mit Geschwulstvirus der Maus als Regulationsstörung in vivo.
Verh. dtsch. Ges. Path. 46, 357 (1962)

5. Georgii A.:
Über das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus in Laboratoriumsgeschwülsten.
Klin. Wschr. 42, 559 (1964)

6. Georgii A., H.Bayerle, D.Brdiczka u. H.Zobl:
Über ein die Lactatdehydrogenase im Serum aktivierendes Virus aus Geschwülsten der Maus.
Z. Krebsforsch. 65 334 (1963)

7. Georgii A.u.D.Brdiczka:
Die Überlebenszeit des Lactatdehydrogenase-Agens aus Mäusegeschwülsten in Fibroblastenkulturen bei längerer Inkubation.
Z. Krebsforsch. 66, 207 (1964)

8. Georgii A., L.Thorn u. H. Wrba:
Die Replikation von Riley's Enzym-erhöhendem Virus in embryonalen Mäusefibroblasten.
Z. Naturforsch. 21b, 288 (1966)

9. Lenta, S.M.P.a S.M.A.Riehl:
Dehydrogenase studies of tissue from normal and tumor bearing mice. II. Lactic and malic dehydrogenases.
Cancer Res. 9, 47 (1949)

10. Lenz, I.:
Das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus aus Mäusegeschwülsten (Riley-Virus). II. Versuche zur Virusvermehrung in verschiedenen Zellkulturen.
Inaug.-Diss. München 1965

11. Löblich H.J. u. Ch.Landschütz:
Vergleichende elektronenoptische Untersuchungen am Ehrlich- und SaI-Ascitestumor.
Krebsforsch. 63, 269 (1960)

12. Mahy, B.W.J. and K.E.K. Rowson:
Isoenzymic Specifity of Impaired Clearence in Mice Infected with Riley Virus
Science 149, 756 (1965)

13. Mundy, J.a.P.C.Williams:
Transmissible agent associated with some mouse neoplasms.
Science 134, 834 (1961)

14. Notkins, A.L. RJ.Berry J.B.Moloney a. R.E.Greefield:
Relationship of the lactic dehydrogenase factor to certain murine tumors.
Nature (London) 193, 79 (1962)

15. Notkins, A.L. a. S.J.Sochat:
Studies on the multiplication and the properties of the lactic dehydrogenase agent.
J.exp.Med. 117, 735 (1963)

16. Prechtel, K.:
Über das Ferment-erhöhende Virus aus Laboratoriumsgeschwülsten der Maus (Riley-Virus). III. Virusinaktivierung durch Kälte, Hitze, Formol und Natriumdesoxycholat.
Inaug.-Diss. München 1965

17. Rauen H.M. a. H. Hupe:
Das Lactatdehydrogenase-Agens im Blut tumortragender Mäuse.
Arzneimittel-Forsch. (Drug-Res.) 13, 1933 (1963)

18. Riley, V.:
Adaption of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 104, 751 (1960)

19. Riley, V., E. Huerto, F. Lilly, D.Bardell, J.D.Loveless a. M.A.Fitzmaurice:
Some characteristics of virus-like entities associated with thirty varieties of experimental tumors.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 261 (1961)

20. Riley, V., J.D.Loveless a. M.A.Fitzmaurice:
Comparison of a lactate dehydrogenase elevating viruslike agent and Eperythrozoon Coccoides.
Proc. Soc. exp. Biol. 116, 486 (1964)

21. Rowson, K.E.K., B.W.Mahy a. M.H. Salaman:
Size estimation by filtration of the enzyme elevating virus of Riley.
Life Sci. 7, 479 (1963)

22. Zobl, H.:
Das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus aus Mäusegeschwülsten (Riley-Virus). I. Sein Vorkommen in einigen Geschwülsten und einige Eigenschaften bei seiner Übertragung.
Inaug.-Diss. München 1965

G. LEBENSLAUF

Am 27. 7. 1940 wurde ich in Klagenfurt als Tochter des derzeitigen Oberregierungsbaudirektors Otto Kirschenhofer und seiner Frau Else, geborene Fuß, geboren.
1944 übersiedelte die Familie nach Stein a.d.Traun und 1945 nach Riedering bei Rosenheim, wo ich von 1946 - 1950 in die Volksschule ging. Von 1950 ab besuchte ich die Oberrealschule in Aschaffenburg. 1955 zogen wir nach München. Dort setzte ich meine Schulzeit bis zur 7.Klasse fort. 1958 trat ich in das Mädchen-Gymnasium in Bensheim über, das ich am 5. März 1960 absolvierte.
Am 1. Mai 1960 begann ich mit dem Medizinstudium. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich 1961, die ärztliche Vorprüfung 1963 ab. Am 24. Juni 1966 bestand ich das ärztliche Staatsexamen.
Vom 1. September 1966 bis 1. Mai 1967 war ich im Städt. Krankenhaus Rosenheim in der chirurgischen Abteilung als Medizinalassistentin tätig.
Seit 1. Mai 1967 arbeite ich in der Medizinischen Poliklinik in Würzburg.